

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

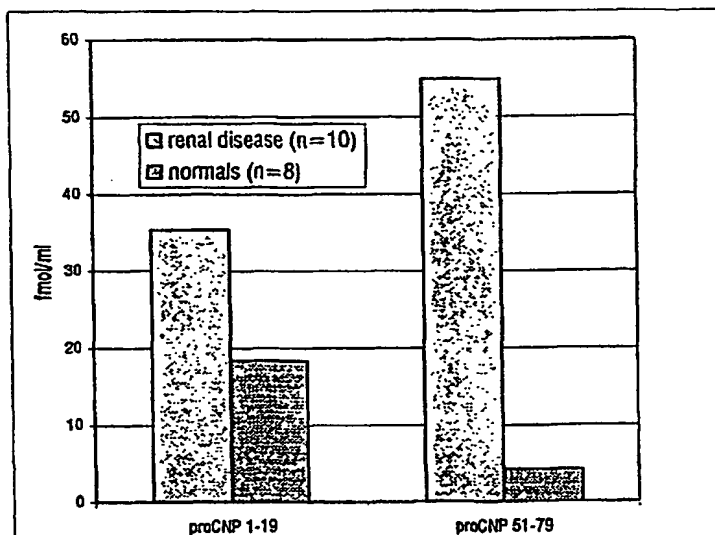
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/14885 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/68 (72) Erfinder; und
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT00/00224 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WOLOSZCZUK,
Wolfgang [AT/AT]; Wlassakstr. 26, A-1130 Wien (AT).
(22) Internationales Anmeldedatum: 17. August 2000 (17.08.2000) HAWA, Gerhard [AT/AT]; Untere Kaistrasse 24/6/8,
A-1100 Wien (AT).
(25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: ITZE, Peter; c/o Patentanwälte Casati Wilhelm,
Itze Peter, Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(30) Angaben zur Priorität: A 1444/99 20. August 1999 (20.08.1999) AT (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: INDICATOR PEPTIDE FOR DIAGNOSING AND/OR PREDICTING CARDIOVASCULAR AND/OR ENDOTHE-
LIAL DISEASES, ANTIBODY COMPOSITION AND IMMUNOASSAY

(54) Bezeichnung: INDIKATORPEPTID ZUR DIAGNOSE UND/ODER VORHERSAGE VON CARDIOVASCULÄREN
UND/ODER ENDOTHELIALEN ERKRANKUNGEN, ANTIKÖRPERZUSAMMENSETZUNG UND IMMUNOASSAY



(57) Abstract: An invention relates to an indicator polypeptide for diagnosing and/or predicting cardiovascular and/or endothelial diseases. Said peptide is the N-terminal fragment proCNP (1-80)(SEQ.ID NO:1) of the C-type natriuretic precursor (1-126 amino acids, Swiss Prot; P23582).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/14885 A2



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Indikatorpolypeptid zur Diagnose und/oder Vorhersage von cardiovasculären und/oder endothelialen Erkrankungen, wobei das Peptid, das N-terminale Fragment proCNP (1-80)(SEQ.ID NO:1) des C-Typ-natriuretischen Precursors (1-26 Aminosäuren, Swiss Prot; P23582) ist.

Indikatorpeptid zur Diagnose und/oder Vorhersage von cardiovasculären und/oder endothelialen Erkrankungen. Antikörperzusammensetzung und Immunoassay

Die Erfindung bezieht sich auf ein Indikatorpeptid zur Diagnose und/oder 5 Vorhersage von cardiovasculären und/oder endothelialen Erkrankungen, auf eine Antikörperzusammensetzung zur Bestimmung von C-Typ natriuretischen Peptiden sowie auf ein Immunoassay-Verfahren für pro CNP(1-80), einen Immunoassay zur Bestimmung von humanem pro CNP(1-80) und ein in vitro-Diagnose- bzw. Prognoseverfahren.

10 Cardiovasculäre Schäden sind häufige klinische Krankheiten, die zu verschiedenen Syndromen beitragen oder, speziell bei älteren Personen, dafür verantwortlich sind, wie z.B. für Arteriosklerose, Nierenversagen u.dgl. Es gibt einige Marker, die in der Lage sind, die Diagnose von solchen Zuständen zu erleichtern. Es ist verständlich, daß einfache Screening-Verfahren, die Risikopersonen identifizieren und 15 eine rasche Diagnose erlauben, hilfreich für ein zeitgerechtes Einschreiten und Verhindern des Fortschreitens der Krankheiten sind. Es ist daher wünschenswert, solche Risikopersonen schon zu identifizieren, bevor sich die Krankheit ausgebildet hat, um so ein zeitgerechtes Einschreiten der Medizin zu ermöglichen.

Derzeit gibt es wenige Methoden, die die Wahrscheinlichkeit von 20 cardiovasculären Erkrankungen vorherzusagen vermögen. Häufig beobachtete Probleme mit derartigen Verfahren sind die ungenügende Genauigkeit und Empfindlichkeit oder das Erfordernis nach Ausarbeitung von Untersuchungen oder einer teuren Ausrüstung, für die ein speziell trainiertes Personal erforderlich ist. Es besteht daher der Bedarf für ein einfaches Verfahren einer genauen und empfindlichen 25 Methode, die nicht nur diagnostiziert, sondern auch die Wahrscheinlichkeit einer cardiovasculären Erkrankung vorhersagen kann, u.zw. entweder als chronischer Zustand oder als akuter Zustand, wie beispielsweise septische Komplikationen. Personen mit besonderem Risiko vor dem Auftreten größerer Schäden identifizieren, erfassen und behandeln zu können, würde große klinische Bedeutung haben. Derzeit 30 existierende Behandlungen sind teuer und auch alternative Erfindungen sind kostenaufwendig, sodaß es nicht kosteneffektiv ist, jedermann ohne Indikation in der Absicht zu behandeln, das Entstehen einer Krankheit zu verhindern.

C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) ist ein Polypeptid, das ursprünglich aus Schweinehirn durch T. Sudoh und seine Mitarbeiter (Biochem. Biophys. Res. Commun., 168:863-879, 1990) isoliert wurde. Nach Klonieren und Durchführen der Sequenzanalyse der cDNA, die für das Peptid kodiert, wurde gezeigt, daß 5 menschliches CNP im menschlichen Vascularsystem durch Endothelialzellen erzeugt wird (S. Suga et al, J.Clin Invest 1992; 90: 1145 - 9). Es wird angenommen, daß menschliches C-Typ natriuretisches Peptid als ein Precursor, der aus 126 Aminosäuren besteht, produziert wird. Von den ersten 23 Resten wird angenommen, daß sie als Signalpeptid wirken, wobei diese ersten 23 Reste abgeschnitten werden, um proCNP 10 zu erhalten (proCNP oder CNP(1-103)). ProCNP wird vor oder während der Sekretion gespalten, um die biologisch aktive Form von CNP, CNP-22 zu bilden. Eine am N-Terminus verlängerte Form, CNP 53, ist die hauptsächlich im Schweinehirn (Minamino et al, Biochem. Biophys. Res. commun. 1990, 170:973-9) vorkommende molekulare Form von CNP. CNP Immunreaktivität wurde in menschlichen 15 Vascularendothelzellen (Singo et al Am. J. Physiol 199; 263: H1318-21) in Plasma und in Nieren (Mattingly et al. Kidney Int. 1994; 46: 744-7) gefunden. Die Plasmakonzentrationen von proCNP (1-80) und proCNP (1-50), das sind die Peptide, die aus den ersten 80 bzw. 50 Aminosäure, gerechnet vom N-Terminus von proCNP bestehen, sind in Patienten, die an endothelialen Erkrankungen (z.B. Arteriosklerose, 20 Naruka T. et al, Circulation 1996; 94:3103-8) und Nierenversagen (Igaki T. et al, Kidney Int. Suppl. 1996, 55: 144-7) leiden, erhöht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Überlegung, daß die N-terminalen Fragmente von menschlichem proCNP (1-103)(SEQ ID NO:1), ähnlich wie proCNP (1-80) und proCNP (1-50), aufgrund ihrer gegenüber CNP-Hormonen (CNP-22 bzw. 25 CNP 53) langen Halbwertszeit als gute diagnostische Indikatoren oder Prognosemittel für alle Fälle von endothelialen Schäden oder renalen Krankheiten, z.B. Risiko für Arteriosklerose, septischen Schock oder chronischer Nierendysfunktion dienen können.

Menschliches proCNP (1-80) (SEQ ID NO:1) und proCNP (1-50) kann daher als Basis entweder für ein Diagnose- oder für einen Prognosetest für die vorgenannten 30 Zustände, und auch in erster Linie für die Biosynthese von Antikörpern, zum Gebrauch in solchen Tests dienen, weiters aber auch als Antigen für einen kompetitiven Bindungsimmunoassay. ProCNP(1-80) (SEQ ID NO:1) oder ein immunogenes

Fragment daraus kann vorteilhafterweise an ein immunogenes Protein oder Peptid, wie es aus dem Stand der Technik bekannt ist, konjugiert werden.

Demgemäß liegt die Erfindung in der Schaffung eines Indikatorpolypeptids zur Diagnose und/oder Vorhersage von cardiovasculären und/oder endothelialen 5 Erkrankungen, wobei das Polypeptid erfindungsgemäß das N-terminale Fragment proCNP (1-80)(SEQ ID NO:1) des C-Typ natriuretischen Prekursors Aminosäure (1-126) Swiss Prot. P23582) ist.

Derartige Polypeptide können zur Erzielung polyklonaler oder monoklonaler Antikörper eingesetzt werden, die spezifisch auf CNP(1-80) (SEQ ID NO:1) sind.

10 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist es, ein Immunoassay-Verfahren für menschliches CNP(1-80)(SEQ ID NO:1), ein antigenes Fragment davon, oder eine Polypeptidverlängerung davon zur Verfügung zu stellen, wobei der primäre Bindungspartner ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung ist. Immunoassays sind natürlich im Stand der 15 Technik bekannt, wie z.B. RIA, EIA, Fluoreszenzimmunoassay (FIA) oder Trockenchemieteststreifen-Immunoassays. So ein Immunoassay verwendet grundsätzlich einen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper gemäß der Erfindung in immobilisierter Form, z.B. an einer Mikrotiterplatte, an Membranen oder Partikel, um die Ziel-Verbindung proCNP(1-80) zu isolieren. In einem Sandwichassay kann das 20 gebundene Antigen mittels eines zusätzlichen löslichen Antikörpers gemäß der Erfindung, der ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper sein kann, nachgewiesen werden. Dieser Antikörper kann entweder eine Markierung tragen oder, noch einfacher, selbst später durch Reaktion mit einem zweiten Antikörper, der eine Markierung trägt, markiert werden. Wenn dabei also der erste Antikörper gemäß der 25 Erfindung in einem Schaf gezüchtet wurde, kann der zweite Antikörper ein Antischafantikörper sein.

Geeignete Markierungen umfassen Radionuklide, fluoreszierende Substanzen, z.B. Europium basierte Hybridverfahren, Farbstoffe oder gefärbte Partikel, wie z.B. kolloidales Gold. Alternativ kann ein Bindungsassay verwendet werden, bei welchem 30 eine bekannte Menge von markiertem menschlichem proCNP(1-80) (SEQ.ID NO.1) oder ein antigenes Fragment davon einer Analytlösung zugesetzt und mit einer begrenzten Menge von immobilisiertem Antikörper in Kontakt gebracht wird, wodurch

die Menge des markierten Antigens, welches immobilisiert wird, umgekehrt proportional der Menge des im Analyt vorhandenen Zielantigens ist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Immunoassay-Kit aus menschlichem proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1), einem antigenen Fragment davon 5 oder einer Polypeptidverlängerung davon, welche folgendes enthält:

- (a) einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung in immobilisierter Form, und
- (b) eine weitere Komponente ausgewählt aus
 - (bi) , eine markierte Probe von menschlichem proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1) oder 10 ein antigenes Fragment davon,
 - (bii) ein Antikörper in nicht immobilisierter Form, und
 - (biii) ein markierter zweiter Antikörper, der spezifisch für den nicht immobilisierten Antikörper gemäß (bii) ist.

Ein solcher Immunoassay und Testsatz kann dazu verwendet werden, verwandte 15 biologische Systeme zu untersuchen, sowie auch Diagnosen oder Prognosen von Zuständen zu stellen, in welchen der Titer von menschlichem proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1) in Körperflüssigkeiten ein diagnostischer oder präventiver Indikator ist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Diagnose oder Prognose von Zuständen, in welchen die Konzentration von 20 menschlichem proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1) oder einem antigenen Fragment oder einer Polypeptidverlängerung davon ein diagnostischer oder prädiktiver Indikator ist, bei dem Körperflüssigkeit eines Patienten in vitro einem Immunoassay unterworfen wird, um die Gegenwart oder Menge von menschlichem proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1) darin aufzufinden oder zu bestimmen.

25 Resultate von unter Dialysebehandlung stehenden Patienten zeigen eindeutig, daß das proCNP-Niveau deutlich bei Patienten erhöht ist, welche an chronischer Nierenfunktionsstörung leiden. Dies wird auch noch dadurch gestützt, daß proCNP in sogenannten Hemofiltraten von Dialysepatienten aufgefunden wird (siehe auch Schulz-Knappe et al J.Chromatogr.A776 (1997) 125-132), wie dies in Fig. 3 illustriert 30 ist.

Folgende Konzentrationen wurden gefunden:

CNP3:1,7 pmol/l

CNP1: 12,4 pmol/l Hemofiltrat.

Hemofiltrate wurden deshalb verwendet, weil sie nahezu unbeschränkt vorliegen und überdies die Peptidhormonkonzentrationen jener von menschlichem Plasma sehr ähnlich sind (Schulz-Knappe et al Eur.J.Med. Res.(1995/96) 1:223-236).

5 Demgemäß können die Immunoassays zur Beobachtung von chronischer Nierenfehlfunktion eingesetzt werden.

Obwohl derzeit wenig dokumentiert, kann humanes proCNP (1-80) (SEQ ID NO:1) auch als diagnostisches Werkzeug zur Risikoabwägung für die Entwicklung von Arteriosklerose eingesetzt werden (Naruka T. et al, circulation 1996, 94:3103-8).

10 Die Körperflüssigkeit, an welcher der Immunoassay ausgeführt wird, kann jegliche Körperflüssigkeit sein, in welcher menschliche proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1) vorhanden ist; es wird aber üblicherweise Plasma-Serum oder Harn verwendet werden. In einigen Fällen kann es angezeigt sein, die Peptide zu extrahieren oder die Probe vor der Durchführung des Assays anderweitig zu behandeln.

15 Das menschliche proCNP (1-80)(SEQ ID.NO:1) Peptid oder ein Antigen oder immunogenes Fragment davon kann mit in der Wissenschaft gut bekannten Techniken durch Synthese aus den sie bildenden Aminosäuren zusammengestellt oder durch das Zusammensetzen von vorsynthetisierten Aminosäureblöcken gebildet werden. Rekombinante Expression von Peptiden ist natürlich eine andere, sehr passende
20 Methode zur Erzeugung des Antigens für die Immunisierung. Wo markiertes Material notwendig ist, kann die Markierung durch Standardtechniken eingebracht werden.

Zum Zweck der Herstellung von Antikörpern kann das menschliche proCNP(1-80)(SEQ.ID NO:1) oder ein antigenes Fragment davon an ein immunogenes Protein oder Peptide, wie es Stand der Technik ist, konjugiert werden.

25 Die erfindungsgemäßen Antikörper können durch Injizierung von proCNP-Antigen gemäß der Erfindung in ein Wirtstier hergestellt werden, u.zw. vorteilhafterweise durch ein Konjugat mit einem immunogenen Protein wie vorstehend beschrieben. Geeignete Wirtstiere sind z.B. ein Schaf, um entweder ein Serum, welches polyklonale Antikörper enthält, oder z.B. eine Maus oder ein Kaninchen, um
30 Milzzellen für die Umwandlung zu Hybridomas oder immortalisierten Zelllinien zu gewinnen und damit monoklonale Antikörper herzustellen.

Beispiel 1: Produktion von polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern gegen CNP(1-80)

Konjugation:

3 synthetisierte Fragmente aus proCNP (1-80)(SEQ ID NO:1): proCNP (1-19), 5 proCNP (29-50) und proCNP (51-79) wurden durch die Fa. Pichem GmbH, in Graz (Österreich) synthetisiert und an ein passendes Trägerprotein konjugiert (z.B. Thyroglobulin).

Immunisierung:

18 Schafe wurden verwendet. Die Schafe erhielten 2 mg des entsprechenden 10 Antigens, das mit nicht ulcerativem Freund'schem Adjuvans (Guildhay, GB) und BCG (bacillus Calmette Guerlin) gemischt ist

Screening:

Mikrotiterplatten wurden mit synthetischen proCNP Peptidsequenzen (1 µg/ml) beschichtet. Probeblut wurde in Phosphatpuffer mit 3%igem BSA 1 : 15 1000/10000/100000 verdünnt, und die Bindung eines Antikörpers wurde durch Zusatz von Antischaf IgG-Peroxidase-Konjugat, gefolgt von Substratzugabe (TMB) nachgewiesen.

Monoklonale Antikörper können analog hergestellt werden, wobei Mäuse oder Kaninchen als Wirtstiere verwendet werden und Hybridomas nach im Stand der 20 Technik bekannten Verfahren hergestellt werden.

Beispiel 2: Immunoassay für proCNP(1-80) (SEQ ID NO:1) oder immunreaktive Fragmente davon.

Die Antikörper können in verschiedenen Arten von Immunoassay für proCNP(1-80)(SEQ ID NO:1) oder immunreaktiven Fragmenten davon verwendet 25 werden. Diese sind u.a.

(a) Radioimmunoassay (RIA)

(b) Enzymimmunoassay (EIA)

(c) Enzymgebundenes Immunosorbentassay (ELISA) einschließlich 30 "sandwich"-Typ Methoden, die auf Mikrotiterplatten oder Membranen ausgeführt werden.

(d) verschiedene trockenchemische Teststreifenimmunoassays.

Nachfolgend ist ein Beispiel basierend auf einem kompetitiven Enzymimmunassay wiedergegeben. Mikrotiterplatten werden mit Schafantikörpern vorbeschichtet. Dann wird der spezifische proCNP Antikörper zugesetzt und für drei bis fünf Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Alternativ dazu 5 können Platten, die mit proCNP vorbeschichtet sind und mit Karion F (Merk, Nr. 2993) stabilisiert sind, verwendet werden.

200 µl der Probe oder des Standards zusammen mit 50 µl eines Tracers (Biotin-markiertes proCNP(1-80) oder ein Fragment davon) wird in die Vertiefungen eingegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vertiefungen werden 10 gewaschen und mit 200 µl von Streptavidin-Peroxidase von Southern Biotechnology (SB-7100-05) inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift und Zusatz von Substrat (Tetramethylenbenzidin, TMB) bildet sich eine Farbe aus, die umgekehrt proportional zu der proCNP-Konzentration der Probe ist und in einem Mikrotiterplattenphotometer gemessen wird. Ein Beispiel einer Standardkurve für proCNP(1-19) und proCNP 15 (51-79), die mit dieser Art von Assay erhalten wurden, ist in Fig. 2 wiedergegeben.

20

25

30

Sequenzprotokoll SEQUENZ ID.-Nr. 1

<110> Biomedica GmbH
 <120> proCNP Immunoassay
 <160> 1
 5 <210> 1
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

 <400> Lys Pro Gly Ala Pro Pro Lys Val Pro Asn
 1 5 10
 10 Thr Pro Pro Ala Glu Glu Leu Ala Glu Pro
 15 20
 Gln Ala Ala Gly Gly Gly Gln Lys Lys Gly
 25 30
 Asp Lys Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ala Asn
 35 40
 Leu Lys Gly Asp Arg Ser Arg Leu Leu Asn
 45 50
 15 Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala
 55 60
 Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro
 65 70
 Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys
 75 80

 20

 25

 30

Patentansprüche:

1. Indikatorpolypeptid zur Diagnose und/oder Vorhersage von cardiovasculären
5 und/oder endothelialen Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid, das
N-terminale Fragment proCNP (1-80)(SEQ.ID NO:1) des C-Typ-natriuretischen
Precursors (1-126 Aminosäuren, Swiss Prot; P23582) oder ein Fragment davon ist.
2. Antikörperzusammensetzung zur Bestimmung von C-Typ natriuretischen
Peptiden, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Antikörper enthält, der spezifisch an
10 ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 bindet, welches aus den Aminosäuren 1 - 80 des
N-terminus des menschlichen pro C-Typ natriuretischen Peptiden (pro CNP(1 - 80))
(SEQ. ID. No. 1), oder eines Fragmentes davon besteht.
3. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß
der Antikörper ein polyklonaler Antikörper ist.
- 15 4. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß
der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.
5. Antikörperzusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch
gekennzeichnet, daß der Antikörper mit einer Markierung versehen ist.
6. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß
20 die Markierung ein Radionuklid, Biotin, eine fluoreszierende Substanz, ein Enzym, ein
Farbstoff oder gefärbte Partikel sind.
7. Antikörperzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch
gekennzeichnet, daß der Antikörper an einem festen Träger immobilisiert ist.
8. Immunoassayverfahren für proCNP(1 - 80), (SEQ. ID. No.1), gekennzeichnet
25 durch folgende Schritte:
 - a) Kontaktieren einer Patientenkörperflüssigkeit mit einem primären
Antikörper nach einem der Ansprüche 2 bis 6, um einen Komplex aus Antikörper und
proCNP(1 - 80) (SEQ. ID. No. 1) zu bilden; und
 - b) Messung der Bildung dieses Komplexes.
- 30 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein an
Mikrotiterplatten, Membranen oder Partikeln (Beads) immobilisierter Antikörper
eingesetzt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung der Bildung des Komplexes aus Antikörper und proCNP(1 - 80) (SEQ. ID. No. 1) dieser Komplex mit einem zweiten Antikörper, der an proCNP(1 - 80) (SEQ. ID. No. 1) bindet, in Kontakt gebracht wird, um einen Sekundärkomplex aus 5 beiden Antikörpern und proCNP zu bilden, der dann in Form eines Sandwichassays erfaßt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Antikörper am festen Träger immobilisiert wird und daß eine bekannte Menge von markiertem humanem proCNP(1 - 80)(SEQ. ID. No. 1) oder ein markiertes 10 Antigenfragment davon der in Lösung befindlichen Körperflüssigkeit zugesetzt wird, um einen kompetitiven Bindungsassay zu erzielen.

12. Immunoassay zur Bestimmung von humanem CNP(1 - 80) (SEQ. ID. No. 1), welcher folgendes enthält:

a) einen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6 in 15 immobilisierter Form und

b) wenigstens eine weitere Zusammensetzung aus folgender Gruppe:

- b i) eine markierte Probe von menschlichem proCNP(1 - 80) (SEQ. ID. No. 1) oder ein antigenes Fragment davon.
- b ii) ein Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie
- 20 b iii) ein markierter zweiter Antikörper, der speziell an einem Antikörper nach einem der Ansprüche 1 und 3 bindet.

13. In vitro-Diagnose- bzw. -Prognoseverfahren für Krankheiten, die zu einer erhöhten Bildung von proCNP führen, bei welchem eine Körperflüssigkeit eines Patienten mit einem ersten Antikörper nach einem der Ansprüche 2 bis 4 in Kontakt 25 gebracht wird, um einen Komplex aus erstem Antikörper und proCNP(1 - 80)(SEQ. ID. No. 1) zu bilden, und die Bildung des genannten Komplexes gemessen wird, um die Konzentration von proCNP(1 - 80)(SEQ. ID. No.1) in der Körperflüssigkeit zu bestimmen, wobei eine erhöhte Konzentration von proCNP(1 - 80)(SEQ. ID. No.1) im Vergleich zur Konzentration bei normalen Personen zur Diagnose von 30 kardiovaskulären und endothelialen Erkrankungen genutzt wird.

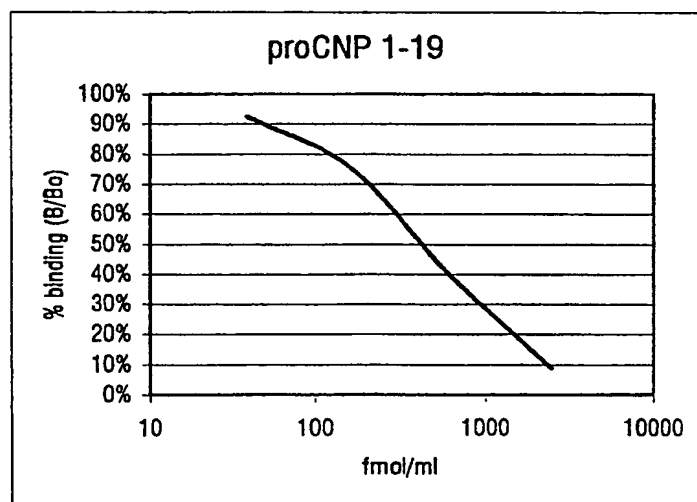
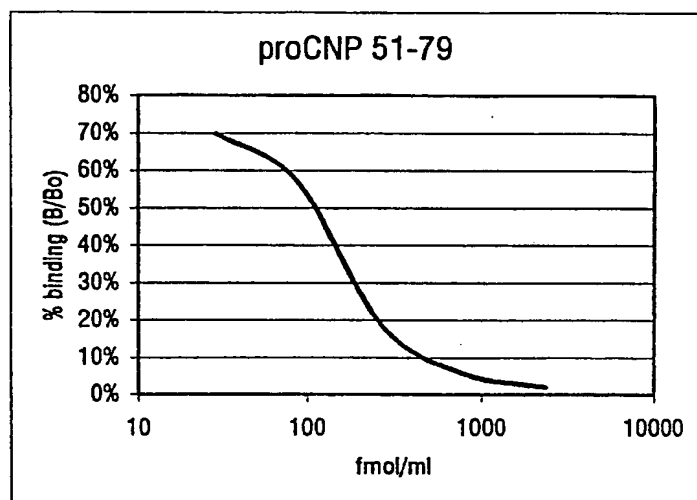


Figure 1

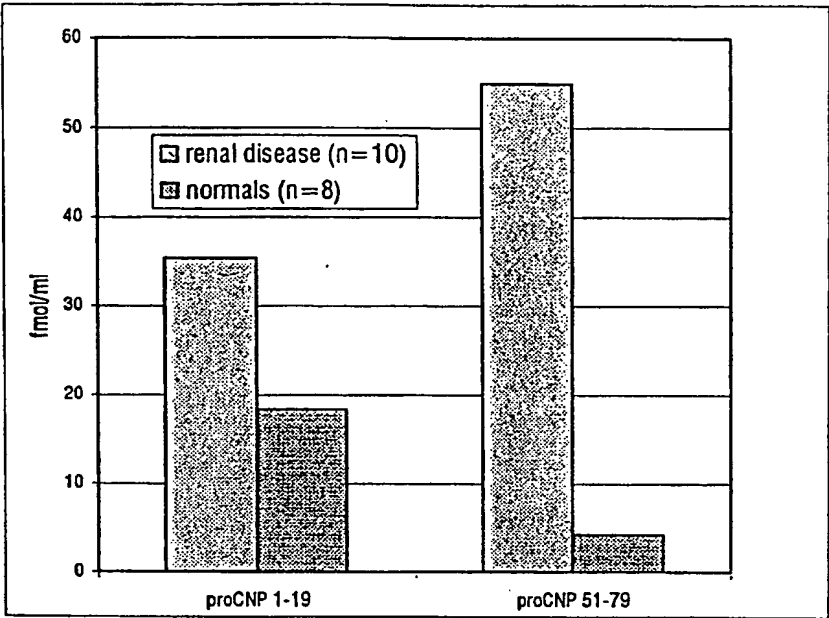


Figure 2

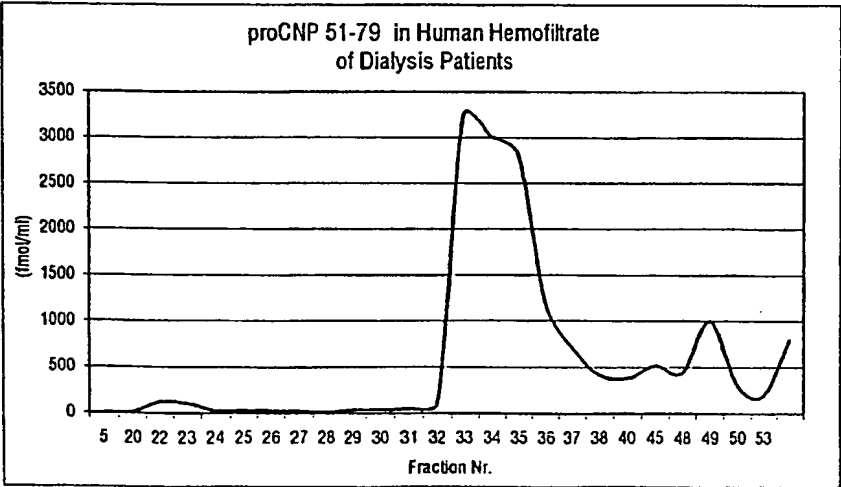


Figure 3

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
K P G A P P K V P R T P P A E E L A E P Q A A G G G Q K K G D K A P G G G A N
41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
L K G D R S R L L R D L R V D T K S R A A W A R L L Q E H P N A R K Y K G A N K